

COMUNICACIÓN BREVE

Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas

Diana Carolina Suárez, Ángela Patricia Rey, Magda Lorena Orduz, Renzo Leonardo Prada, Zorayda Tarazona

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, el cual puede ser transmitido por diferentes vías. A partir de 2005 la transmisión oral se incrementó en aquellos países donde la enfermedad es considerada endémica por transmisión vectorial. Colombia no se aparta de esta tendencia, situación que motivó la alerta epidemiológica, buscando la necesidad de encontrar explicación a la infección oral de la parasitosis.

Objetivo. Establecer registros del tiempo de supervivencia de la cepa DS de *T. cruzi*, usando los jugos implicados en el brote del municipio de Lebrija (Santander) en el 2008.

Materiales y métodos. Se evaluó la supervivencia según el conjunto de criterios de vitalidad (movimiento progresivo) y viabilidad (aislamiento en medio de cultivo Novy, McNeal y Nicolle/infusión de hígado y triptosa) de la cepa DS de *T. cruzi* caracterizada molecularmente como Tcla, aislada de un paciente del brote del municipio de Aguachica (Cesar), en jugos de mandarina, de guayaba y de guanábana, en agua y en agua con azúcar.

Resultados. La cepa DS de *T. cruzi* se mantuvo vital en jugo de mandarina 72 horas a temperatura ambiente y luego de 36 horas de refrigeración; en jugo de guanábana, 48 horas a temperatura ambiente, y 384 horas en refrigeración, y, en jugo de guayaba, 24 horas en las dos temperaturas. Esta cepa fue viable 2 y 24 horas después de la contaminación de cada uno de los jugos a las temperaturas estudiadas.

Conclusiones. La cepa DS de *T. cruzi* sobrevivió en todas las bebidas por más de 24 horas después de la contaminación y se observó un tiempo de supervivencia de 384 horas a temperatura de refrigeración en el jugo de guanábana.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, zumos, bebidas, supervivencia.

Survival of *Trypanosoma cruzi* in experimentally contaminated drinks

Introduction. *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, transmitted primarily by triatomine insects. However, in 2005, oral transmission was documented in countries where the disease is endemic for Chagas disease. This trend may also occur in Colombia, a situation that motivated epidemiological alerts and the necessity for exploring the risk level of oral, human-to-human infection by *T. cruzi*.

Objective. Survival times were established for the *T. cruzi* strain DS using juices involved in the outbreak of Lebrija County (Cesar, Colombia) in 2008.

Materials and methods. Survival of the *T. cruzi* strain was evaluated as defined by vitality (forward movement) and viability (growth in isolation medium Novy, McNeal and Nicolle/liver infusion tryptose). This strain was molecularly characterized as TCLA, isolated from a patient associated with an outbreak in Aguachica County (Santander, very near Lebrija). Its survival was tested in tangerine juice, guava, soursop (*guanábana*), water and sugar water.

Results. The *T. cruzi* strain DS remained vital in mandarin at room temperature for 72 hr, at refrigerated temperatures for 36 hr; the soursop (*guanábana*) for 48 hr at room temperature and 384 hr under refrigeration; and guava at both temperatures 24 hr. This strain was viable 2 and 24 hours post-infection in each of the other juices at the two temperature conditions.

Conclusions: The DS *T. cruzi* strain survived in all drinks for more than 24 hours post-infection, with a survival time of 384 hr in the juice of soursop (*guanábana*) under refrigeration.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas diseases, juices, beverages, survival.

Contribución de los autores:

Diana Carolina Suárez, Ángela Patricia Rey y Zorayda Tarazona: revisión bibliográfica, elaboración del protocolo, ejecución, análisis de datos y redacción.

Magda Lorena Orduz y Renzo Leonardo Prada: revisión bibliográfica y elaboración del protocolo.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, se registran en el mundo entre 10 y 15 millones de personas infectadas y provoca la muerte de 14.000 personas cada año (1).

Esta enfermedad es un problema de salud pública en Latinoamérica, donde la transmisión del parásito ocurre principalmente por las heces de insectos triatomíneos; es menos frecuente la transmisión por transfusiones, congénita, por accidentes de laboratorio, por trasplante de órganos y por vía oral, la cual se ha contemplado ser una vía importante en el ciclo silvestre (2,3).

Al respecto, la recopilación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala a Nathan-Larrier, como pionero en la investigación de esta vía, al comprobar la transmisión oral en pequeños roedores (4). La posibilidad de esta vía de contaminación en humanos data de la misma época, con la aparición de microbrotes de la enfermedad, en grupos de personas que compartían ambientes y una posible ingestión común, además de la ausencia de una puerta de entrada del parásito de carácter vectorial. En estos casos, la enfermedad es más grave y aguda, y el principal síntoma es una miocarditis aguda, que no se observa en la fase primaria o aguda de la transmisión vectorial, por lo cual recibe la denominación de enfermedad de Chagas hiperaguda, fatal en la mayoría de casos (4-8).

La transmisión oral de la enfermedad de Chagas presenta una tendencia al incremento, evidenciada en la serie de publicaciones a partir del 2005 en aquellos países donde la enfermedad se considera endémica; Colombia no se aparta de esta tendencia (4,9-12).

Desde 2008 a 2010, la presentación de casos de miocarditis aguda en Santander y Cesar, algunos de ellos fatales, motivó la alerta epidemiológica, originando la necesidad de encontrar explicación a la infección oral de la parasitosis (11-13). Ante esta situación regional, se planteó evaluar la supervivencia de *T. cruzi* en los jugos de las frutas de interés.

Correspondencia:

Diana Carolina Suárez, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Industrial de Santander, Avenida Quebrada Seca N° 32A-17, Bucaramanga, Colombia
Tele-fax: (577) 645-7575
proyectot.cruzi.s@gmail.com

Recibido: 26/05/11; aceptado: 31/10/11

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander, con una duración de tres meses, en el cual la experiencia se hizo por triplicado. Para este estudio se tuvieron en cuenta los eventos del brote del municipio de Lebrija (Santander) (10).

Estandarización de la concentración parasitaria

La cepa utilizada de *T. cruzi*, codificada internamente como DS y caracterizada molecularmente como Tcla, se aisló del líquido pericárdico de una paciente del brote de Aguachica (Cesar), en medios de cultivo Novy, McNeal y Nicolle (NNN), y cultivo en masa en medio líquido LIT (*Liver Infusion-Triptosa*) (13). Mediante recuento en cámara de Neubauer, se determinó la concentración parasitaria, expresada en número de parásitos por microlitro de medio (parásitos/ml).

Jugos naturales y otras bebidas

Se escogieron las frutas de mandarina y guanábana por ser las implicadas en el brote que ocurrió a finales del 2008 en el municipio de Lebrija y, la guayaba por la guayaba, por ser la de mayor consumo según la encuesta aplicada en las poblaciones de Santa Rosa y Palonegro (Santander), en 2009. Se hicieron encuestas en estas poblaciones por su implicación en el brote; los temas que se manejaron en la encuesta estaban orientados a evaluar vivienda, cocina, alimentos, vector y reservorios, que son factores importantes en la teoría de una posible transmisión oral.

Las frutas analizadas procedían de la región, y con ellas se procesaron los jugos según la costumbre familiar; se destaca que, en su preparación, al jugo de guanábana se le adiciona leche cruda de vaca.

Contaminación de los jugos

Para la contaminación de los jugos se adicionaron 0,5 ml ($1,2 \times 10^8$ parásitos/ml) del cultivo en masa del parásito, en el cual se encontraban formas de epimastigotas y tripomastigotas en proporciones iguales a 9,5 ml de cada uno de los jugos, con una concentración final de 6×10^6 parásitos/ml. Los jugos se mantuvieron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en nevera (4 °C); estas dos temperaturas se escogieron por ser las más comunes en una casa de familia para conservar un jugo.

Otras bebidas

El agua y el azúcar son la base de preparación para los jugos, razón por la cual, se analizaron en el estudio, mediante el protocolo descrito para los jugos.

Evaluación de la supervivencia del parásito

La supervivencia de *T. cruzi* se estableció observando la viabilidad y vitalidad del parásito; cada uno de estos atributos se evaluó independientemente, según los siguientes criterios.

Vitalidad. Se definió como el movimiento activo y progresivo del parásito.

Entre lámina y laminilla se observaron 10 µl de cada una de las bebidas, a 21 y 4 °C, con un aumento de 40X. Los montajes y las lecturas se llevaron a cabo durante las primeras 10 horas, cada 30 minutos. Pasadas las primeras 24 horas, este parámetro fue evaluado cada seis horas, hasta dejar de observarse vitalidad del parásito (14,15).

Viabilidad. Se definió como la capacidad del parásito para crecer *in vitro* a partir de alícuotas de las bebidas contaminadas (15).

Transcurridas 2 y 24 horas de la contaminación, se sembraron 500 µl de cada una de las bebidas en medio bifásico NNN/LIT. Pasadas las primeras 24 y 48 horas de siembra, se inspeccionaron al microscopio (40X) para verificar el crecimiento del parásito en los medios de cultivo.

Resultados

Vitalidad

En los jugos de las frutas analizadas, presuntamente implicadas en el brote de Lebrija a finales del 2008 (10), la cepa DS de *T. cruzi* conservó su vitalidad en el jugo de guanábana durante 48 horas a temperatura ambiente y hasta 384 horas a

temperatura de refrigeración. En agua con azúcar sobrevivió 240 horas a temperatura ambiente y 120 horas a temperatura de refrigeración (cuadro 1).

Viabilidad

La viabilidad de *T. cruzi* en los cultivos de cada una de las bebidas, a las 2 y 24 horas de la contaminación, se verificó mediante el crecimiento en los medios de cultivo empleados. Esta característica no se observó en el agua sin azúcar porque, inmediatamente entró en contacto con ella, el parásito sufrió alteraciones morfológicas y posterior desintegración (cuadro 1).

Supervivencia de *Trypanosoma cruzi*

Consolidados los resultados de las variables de vitalidad y viabilidad, en todos los jugos analizados *T. cruzi* sobrevivió más de 24 horas a temperatura ambiente y de refrigeración; se consideró que, generalmente, el tiempo máximo en que se consume un jugo es de 24 horas. Estos mismos resultados se observaron en la experiencia con el agua azucarada, mas no con el agua corriente (cuadro 1).

Discusión

Se encontró que se han adelantado pocos estudios para evaluar la supervivencia del parásito en alimentos y su capacidad infecciosa en estas condiciones, resultados preliminares requeridos para identificar posibles factores de riesgo de contaminación de los alimentos y la comprobación de la transmisión oral de la infección en humanos.

La cepa de *T. cruzi* aislada del brote de Aguachica, caracterizada molecularmente como TcIa, registró una supervivencia mayor de 24 horas en los jugos de guanábana, guayaba y mandarina; este resultado fortalece la hipótesis de la transmisión oral de la infección.

Cuadro 1. Supervivencia de *T. cruzi* en las bebidas analizadas

Bebida	Tiempo de vitalidad a 21 °C	Tiempo de vitalidad a 4 °C	Cultivo (NNN/LIT) 2 horas después de la inoculación (crecimiento)		Cultivo (NNN/LIT) 24 horas después de la inoculación (crecimiento)	
			Temperatura ambiente (21°C)	Temperatura de refrigeración (4°C)	Temperatura ambiente (21°C)	Temperatura de refrigeración (4°C)
Mandarina	72 horas	36 horas	Sí	Sí	Sí	Sí
Guanábana	48 horas	384 horas	Sí	Sí	Sí	Sí
Guayaba	24 horas	24 horas	Sí	Sí	Sí	Sí
Agua	10 a 15 s	10 a 15 s	Sí	Sí	Sí	Sí
Agua con azúcar	240 horas	120 horas	No	No	No	No

En cuanto a la conservación del movimiento y progresión (vitalidad) del parásito, en los jugos a temperatura ambiente, se observó que el de mandarina ofrecía las condiciones más favorables para su conservación, superando por más de 48 horas al jugo de guayaba y por más de 24 horas al de guanábana. En relación con la temperatura de refrigeración, el jugo de guanábana es donde el parásito conserva por mayor tiempo (384 horas) los atributos de vitalidad.

Se verificó la viabilidad del parásito aislándolo a partir de los jugos analizados en los cultivos NNN/LIT, 2 y 24 horas después de la contaminación, teniendo en cuenta que dos horas es el tiempo más común en que se consume un jugo después de preparado y que 24 horas es el tiempo máximo que se guarda antes de consumirlo en las casas encuestadas. También, se destaca la resistencia del parásito en estas condiciones, hecho que se suma a la posibilidad de infección oral.

Respecto al líquido que se agrega a los jugos, se encontró que en el agua con azúcar el parásito se mantiene vital hasta 240 horas a temperatura ambiente, superando en esta condición a los tres jugos analizados, y hasta 120 horas a temperatura de refrigeración, solo superada por el jugo de guanábana en el que se conservó hasta 384 horas. En relación con la viabilidad en este líquido, el parásito presentó un comportamiento similar al que presentó en los jugos.

El parásito sufrió lisis inmediatamente después de entrar en contacto con el agua pura, lo cual indica que no posee las condiciones apropiadas para su supervivencia.

Al comparar estos resultados con los de Añez, en Venezuela, se encuentra que en ambos estudios se valoró la supervivencia del parásito en alimentos consumidos por pobladores de sitios donde la enfermedad es endémica (12,16). Se encontró un tiempo máximo de supervivencia de *T. cruzi* de 384 horas en jugo de guanábana, mayor al de 72 horas en trozos de cambur (banana) encontrado por Añez (16).

A diferencia de este último estudio, en el presente el diseño metodológico ratificó los tiempos de supervivencia observados al incluir los aislamientos que fueron positivos en los jugos de las frutas analizadas y en agua azucarada.

Los tiempos estudiados y el comportamiento del parásito en este experimento, son esenciales para ayudar a apoyar o desmentir la hipótesis de la

transmisión oral por alimentos. En este caso, los resultados indican que la cepa DS de *T. cruzi* (Tcla) puede sobrevivir en bebidas por más de dos horas, lapso en que los habitantes afirman consumir el jugo preparado, lo cual establece una pauta sobre el tiempo en el que podría ocurrir la transmisión por este medio.

Agradecimientos

Agradecemos a la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, a Marleny Montilla del Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, a Omar Triana de la Universidad de Antioquia por la caracterización molecular, a los estudiantes y a las demás personas que de una u otra forma contribuyeron a la ejecución de esta experiencia.

Conflicto de interés

Los autores expresan no tener conflictos de interés.

Financiación

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander y H.C. Medical Ltda.

Referencias

1. **Médicos sin Fronteras, Drug for Neglected Disease Initiative.** Comunicado de prensa. Asamblea Mundial de la Salud: MSF y DNDi urgen a los Estados Miembros a incluir en la resolución de Chagas el acceso al diagnóstico y el tratamiento en la atención primaria. Fecha de consulta: 24 de julio de 2010. Disponible en: http://www.treatchagas.org/md_press_release.aspx?id=18.
2. **Llop H, Valdés-Dapena V, Zuazo S.** Microbiología y parasitología médica. Primera edición. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 54.
3. **Silveira A.** Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de Chagas. En: Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles-DPC/CD/CHA, Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos-DPC/VP/FOS. Informe final consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Río de Janeiro: OPS/OMS; 2006. p. 16-9.
4. **Organización Panamericana de la Salud.** Enfermedad de Chagas. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Río de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS; 2009.
5. **Prata A.** Conceptualización del tema. En: Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles-DPC/CD/CHA, Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos-DPC/VP/FOS. Informe final consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Río de Janeiro: OPS/OMS; 2006. p. 11-2.

6. **Nicholls RS, Cucunubá ZM, Knudson A, Flórez AC, Montilla M, Puerta CJ, et al.** Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el periodo 2002 a 2005. *Biomédica*. 2007;27(Supl.1):8-17.
7. **Yoshida N.** *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*. 2008;57:105-9.
8. **Toso A, Vial F, Galanti N.** Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile*. 2011;139:258-66.
9. **Organización Mundial de la Salud.** Control de la enfermedad de Chagas: Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 2002. p. 1-117.
10. **Hernández L, Ramírez A, Cucunubá Z, Zambrano P.** Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander 2008. Fecha de consulta: 4 de junio de 2010. Disponible en: http://www.saludsantander.gov.co/web/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=5&Itemid=3.
11. **Cáceres D, Nicholls RS, Corredor A, Gualdrón L, Slait E, Dib J, et al.** Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena, 7 a 11 de junio de 1999. *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 1999;4:170-8.
12. **Nicholls RS.** Enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos: la experiencia en Colombia. En: Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles-DPC/CD/CHA, Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos-DPC/VP/FOS. Informe final consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Río de Janeiro: OPS/OMS; 2006. p. 13-4.
13. **Beltrán S, Cáceres E, Corredor A.** Comportamiento de flagelados de la familia Trypanosomatidae en medios de cultivo modificados. *Biomédica*. 1998;8:21-7.
14. **Carreño M, Murcia G.** Semen y su análisis. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 1989. p. 64.
15. **Cardoso A, Lescano S, Amato V, Gakiya E, Santos S.** Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006;48:287-9.
16. **Añez N, Crisante G, Romero M.** Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. *Bol Mal Salud Amb*. 2009;49:91-6.